论著

文章编号:1000-5404(2010)23-2492-05

Notch信号通路在骨形态发生蛋白9诱导的多潜能干细胞成骨分化中的作用

刘 强,翁亚光,徐道晶,罗 敏,唐 敏 (400016 重庆,重庆医科大学医学检验系,临床检验诊断学教育部重点实验室)

【摘要】 目的 初步探讨Notch信号通路对骨形态发生蛋白9(bone morphogenetic protein 9,BMP9)诱导多潜能干细胞成骨分化的作用和机制。方法 腺病毒表达载体(AdBMP9/AdGFP、AdHey1/AdRFP)和BMP9/GFP条件培养基处理C2C12细胞,细胞化学染色和活性定量检测早期成骨标志物碱性磷酸酶(ALP),定量RT-PCR检测Notch信号通路靶基因Hey1,以了解Hey1在AdBMP9介导的成骨分化作用中的表达和作用;采用细胞密度实验和Notch信号通路抑制剂(DAPT)检测Notch信号通路对成骨的影响;在AdBMP9/AdGFP处理下,检测细胞上Notch信号通路配体、受体表达变化。结果 AdBMP9作用下,1、3、5、7 d ALP活性持续增加($P<0.05$);Hey1一过性升高,其与AdBMP9呈剂量依赖性;Hey1可协助BMP9成骨($P<0.05$),不能单独起效。80%和40%细胞密度组ALP量和Hey1表达均高于20%组($P<0.05$);DAPT组中ALP活性明显降低($P<0.05$);在AdBMP9作用下,Notch信号通路配受体有不同程度的上调,其中受体Notch4和配体Jag-1上调最为明显(分别为11.3倍和5.1倍)。结论 Notch信号通路参与BMP9介导的多潜能干细胞成骨分化,其可能的机制是BMP9通过诱导Notch通路配体、受体表达上调使Hey1升高,后者协同成骨。

【关键词】 Notch信号通路;骨形态发生蛋白9;多潜能干细胞;发状分裂相关增强子-1;DAPT

【中图法分类号】 R322.71;R329.21;R394.2 【文献标志码】 A

Role of Notch signaling pathway in bone morphogenetic protein 9-induced osteogenic differentiation of multipotent stem cells

Liu Qiang, Weng Yaguang, Xu Daojing, Luo Min, Tang Min (Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics of Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【Abstract】 Objective To study the role of Notch signaling pathway in bone morphogenetic protein 9 (BMP9) induced osteogenic differentiation of multipotent stem cells and its mechanism. Methods Adenovirus vectors (AdBMP9/AdGFP, AdHey1/AdRFP) and C2C12 cells treated with BMP9/GFP were stained with cell chemistry. Alkaline phosphatase (ALP), an osteogenesis marker, was detected with a quantitative method. Target gene Hey1 of Notch signaling pathway was detected by quantitative RT-PCR in order to study its role in BMP9-induced osteogenic differentiation of multipotent stem cells. Effect of Notch signaling pathway on osteogenesis was detected by cell-density assay and Notch signaling pathway inhibitor (DAPT). After treatment with AdBMP9/AdGFP, ligands of Notch receptor and its expression were detected. Results AdBMP9 increased the activity of ALP on days 1, 3, 5 and 7, while transiently increased the Hey1 expression level in a dose-dependent manner. Although Hey1 itself could not increase ALP, it could help BMP9 to enhance ALP ($P<0.05$). The expression level of ALP and Hey1 was higher in 40% and 80% cell density groups than in 20% cell density group ($P<0.05$). The ALP activity was lower in DAPT group than in control group ($P<0.05$). The number of Notch receptors and ligands was greater in BMP9 group than in GFP group, in which the receptor (Notch 4) and the ligand (Jag-1) increased by 11.3 and 5.1 times, respectively. Conclusion Notch signaling pathway can enhance BMP9-induced osteogenic differentiation of multipotent stem cells possibly by up-regulating the expression of its ligands and receptors through BMP9, thus leading to osteogenesis.

【Key words】 Notch signaling pathway; bone morphogenetic protein 9; multipotent stem cells; Hey1; DAPT

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2008BB5396). Corresponding author: Tang Min, Tel: 86-23-68485223, E-mail: catom@126.com

【基金项目】 重庆市自然科学基金(CSTC2008BB5396)

【通信作者】 唐 敏,电话:(023)68485223,E-mail:catom@126.com

多潜能干细胞一定条件下可以分化为成骨细胞、成软骨细胞等,可作为骨关节等疾病细胞治疗和组织工程的理想种子细胞[1]。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins,BMPs)是TGF-β超家族成员之一,在细胞增殖和分化中扮演着重要的调节作用[2-4]。研究证实BMP9诱导成骨分化的作用强于传统的BMP2和BMP7,且在BMP9诱导的多潜能干细胞成骨分化过程中Hey1基因表达明显上调[5,6],但作用机制不明。Hey1基因是具有高度保守性的参与细胞增殖、分化和凋亡等调控的Notch信号通路的经典靶基因[7,8]。研究提示在细胞分化和某些疾病的发生中,Notch信号通路与TGF-β/BMPs信号通路之间存在相互作用[9,10]。本实验拟在明确Hey1在BMP9诱导的多潜能干细胞成骨分化过程中表达情况及其作用基础上,初步探讨Notch信号通路对BMP9诱导成骨分化作用的影响,以丰富完善BMP9诱导多潜能干细胞成骨分化机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

C2C12、HCT116(本实验室保存),AdBMP9、AdGFP、AdHey1、AdRFP(腺病毒表达载体均由本实验室构建和制备),DMEM高糖培养基(HyClone公司),胎牛血清(Gibco公司),碱性磷酸酶(ALP)染色试剂盒及定量检测试剂盒(Sigma公司),DAPT_565784(CALBIOCHEM公司),Trizol试剂(Invitrogen公司),反转录试剂盒(Promega公司),SYBR Green Ⅰ(TaKaRa公司),Rotor Gene 6000荧光定量PCR仪(Corbett Research公司),核酸微量测定仪(Bio-Rad公司),辉光值测定仪(Bio-Scan公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 AdBMP9诱导的C2C12细胞早期成骨标志物ALP的表达 细胞培养和腺病毒处理:复苏冻存的C2C12用10%胎牛血清DMEM高糖培养基培养,待细胞状态较好时接种细胞,8~16 h后当细胞汇合度30%时,加入适量的腺病毒,使其24 h后荧光感染率达到30%。早期成骨标志物ALP检测:在24孔板上接种C2C12细胞,进行分组(每组设置6个平行孔),分别用AdBMP9和AdGFP处理,在1、3、5、7 d对细胞进行ALP细胞化学染色和ALP活性定量检测(操作方法完全按照试剂盒说明书)。

1.2.2 Hey1在AdBMP9处理的C2C12细胞中表达及其作用 定量RT-PCR检测Hey1基因表达水平:将C2C12细胞接种于6孔板,进行分组(每组设置3个平行孔),分别用AdBMP9和AdGFP处理,在1、3、5、7 d 4个时间点提取RNA,逆转录成cDNA,定量RT-PCR检测Hey1的表达水平(β-actin基因为内参);另外,用10、20、40 μl 3种不同剂量(20 μl腺病毒处理细胞24 h后细胞荧光强度达30%)AdBMP9或AdGFP处理C2C12细胞24 h后,定量RT-PCR检测Hey1的表达,引物信息见表1。定量RT-PCR体系(20 μl)为SYBR Green Ⅰ 10 μl、cDNA 1 μl、上下游引物混合物(10 pmol/μl)1 μl、去离子水8 μl;反应参数:预变性94 ℃ 2 min;92 ℃ 20 s,68 ℃ 30 s每循环降2 ℃,72 ℃ 20 s,6个循环;92 ℃ 20 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 20 s延伸末尾采集荧光,40个循环;融解分析(65~99 ℃)。Hey1对BMP9诱导的成骨分化作用的影响:在24孔板上接种C2C12细胞,分成8组,先用3种剂量(4 μl腺病毒处理细胞24 h后细胞荧光强度达30%)AdHey1或AdRFP处理细胞24 h,然后更换成2 ml BMP9或GFP条件培养基(其中添加20%新鲜培养基),组1加AdRFP(4 μl)+GFP(2 ml)、组2加AdHey1(4 μl)+GFP(2 ml)、组3加AdRFP(2 μl)+BMP9(2 ml)、组4加AdHey1(2 μl)+BMP9(2 ml)、组5加AdRFP(4 μl)+BMP9(2 ml)、组6加AdHey1(4 μl)+BMP9(2 ml)、组7加AdRFP(8 μl)+BMP9(2 ml)、组8加AdHey1(8 μl)+BMP9(2 ml),48 h后检测ALP的活性(操作同1.2.1)。BMP9/GFP条件培养基的获得:HCT116细胞使用10%胎牛血清MEM/EBSS培养基培养,细胞达50%时加入AdBMP9或AdGFP,8 h后更换新鲜培养基,分别在24 h和48 h收获培养基并离心取上清,4 ℃保存备用。

表1 定量RT-PCR引物信息

引物名称	引物序列	扩增片段
β-actin	上游引物 5′-CCTGAGGCTCTTTTCCAGCC-3′ 下游引物 5′-TAGAGGTCTTTACGGATGTC-3′	120 bp
Hey1	上游引物 5′-GGCCTGCTTGGCTTTTCT-3′ 下游引物 5′-CCAAGTGCAGGCAAGGTC-3′	110 bp
Notch3	上游引物 5′-CTCTGTGGTGATGCTGGAGA-3′ 下游引物 5′-AATCAAGTCGCTCCACTGCT-3′	128 bp
Notch4	上游引物 5′-AATCGGAGGTTCTGGATGTg-3′ 下游引物 5′-GGGTTCCAGATTTCCTAGCC-3′	134 bp
Jag-1	上游引物 5′-GGAAGTGGAGGAGGATGACA-3′ 下游引物 5′-GTCCAGTTCGGGTGTTTTGT-3′	129 bp

1.2.3 细胞密度对Hey1表达和对ALP的影响 将对数生长期C2C12细胞接种于6孔板上,使其8~16 h后汇合度分别达到20%、40%、80%,进行分组(每组设置3个平行孔),用AdBMP9或AdGFP腺病毒处理,24 h后提取RNA,并逆转录成cDNA,定量RT-PCR检测Hey1的表达水平;将对数生长期C2C12细胞接种到24孔板上,使其8~16 h后汇合度分别达到20%、40%、80%,进行分组(每组设置3个平行孔),用AdBMP9或AdGFP腺病毒处理,24 h后进行ALP细胞化学染色和ALP活性定量检测。

1.2.4 阻断Notch信号通路后对BMP9促成骨分化作用的影响 在24孔板上接种C2C12细胞,待贴壁后用DAPT 4 μl(试剂浓度2 500 μmol/L,处理浓度10 μmol/L)和DMSO 4 μl加到1 ml培养基中分别处理细胞12 h,然后用AdBMP9和AdGFP分别处理细胞7 d,进行ALP活性定量检测。

1.2.5 BMP9对Notch信号通路配、受体表达的影响 用AdBMP9和AdGFP分别处理C2C12细胞5 d,提取总RNA并逆转录成cDNA,进行定量RT-PCR检测,检测受体Notch(1~4),配体Jag-1/2、Dll-1/3/4,部分引物信息见表1。反应体系同1.2.2,反应参数:预变性94 ℃ 2 min;92 ℃ 20 s,68 ℃ 30 s每循环降2 ℃,72 ℃ 20 s,6个循环;92 ℃ 20 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 20 s延伸末尾采集荧光,40个循环;融解分析(65~99 ℃)。

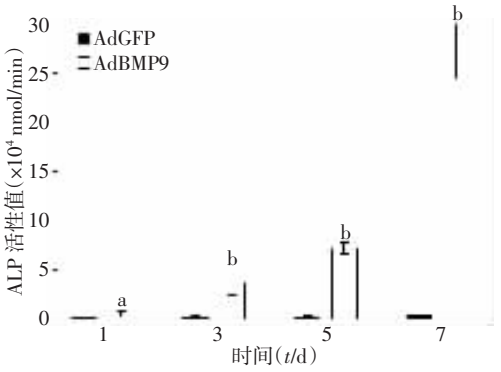
1.3 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 16.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 AdBMP9 诱导的 C2C12 细胞早期成骨标志物 ALP 的表达

将腺病毒(AdBMP9、AdGFP)感染 C2C12 细胞 24 h 后，荧光强度均达到 30% 左右，细胞完全贴壁生长未见污染和悬浮细胞。在 1、3、5、7 d 分别进行 ALP 细胞化学染色和活性定量检测，AdBMP9 处理组皆高于对照 AdGFP 组($P<0.05$，$P<0.01$，图 1、2)，且 ALP 的表达随着处理时间的延长逐渐增加。

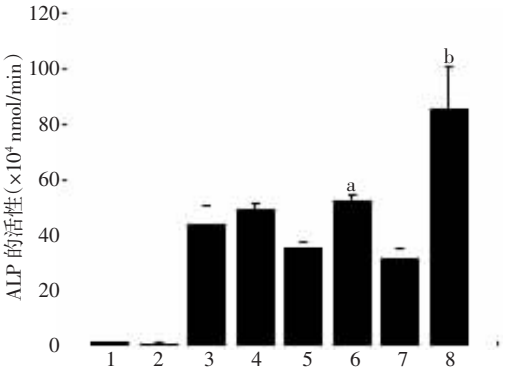


a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与感染 AdGFP 比较

图 2 AdGFP 和 AdBMP9 处理的 C2C12 细胞不同时间 ALP 活性定量结果

2.2 Hey1 在 AdBMP9 处理的 C2C12 细胞中的表达及其作用

定量 RT-PCR 结果显示：在 AdBMP9 作用下，Hey1 表达量在 1、3、5 d 迅速升高，其升高倍数分别为 7.57、15.89 倍和 82.14 倍，达到峰值后迅速下降为 9.99 倍，即为一过性增高；分别用 10、20 μl 和 40 μl AdBMP9 处理细胞，其 Hey1 表达水平分别升高 6.3、7.9 倍和 11.6 倍(与 AdGFP 组相比)，即 Hey1 与 AdBMP9 存在量效关系；另一方面，虽然在 BMP9 存在情况下，AdHey1 对促成骨分化作用有量效关系($P<0.05$，$P<0.01$)，但其没有单独成骨作用(图 3)。



1：AdRFP(4 μl) + GFP(2 ml)；2：AdHey1(4 μl) + GFP(2 ml)；
3：AdRFP(2 μl) + BMP9(2 ml)；4：AdHey1(2 μl) + BMP9(2 ml)；
5：AdRFP(4 μl) + BMP9(2 ml)；6：AdHey1(4 μl) + BMP9(2 ml)；
7：AdRFP(8 μl) + BMP9(2 ml)；8：AdHey1(8 μl) + BMP9(2 ml)

a：$P<0.05$，与组 5 比较；b：$P<0.01$，与组 7 比较

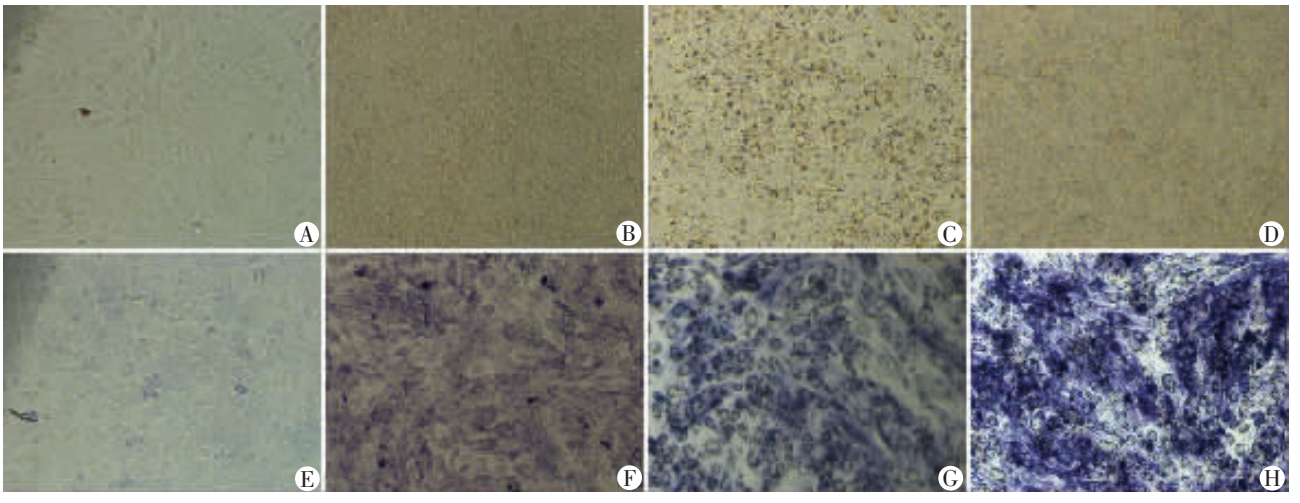
图 3 不同剂量的 AdHey1 对 BMP9/GFP 条件培养基中 C2C12 细胞的 ALP 活性影响

2.3 细胞密度对 BMP9 促成骨分化作用的影响及对 Hey1 表达的影响

在 AdBMP9 作用下的 C2C12 细胞中，40% 和 80% 细胞密度组 ALP 表达皆明显高于 20% 细胞密度组($P<0.05$，$P<0.01$，图 4、5)。与 AdGFP 组比较，AdBMP9 作用下的 C2C12 细胞中 Hey1 表达在 40% 和 80% 细胞密度组升高倍数分别为 5.1 倍和 4.7 倍，均高于 20% 细胞密度组的 3.8 倍。

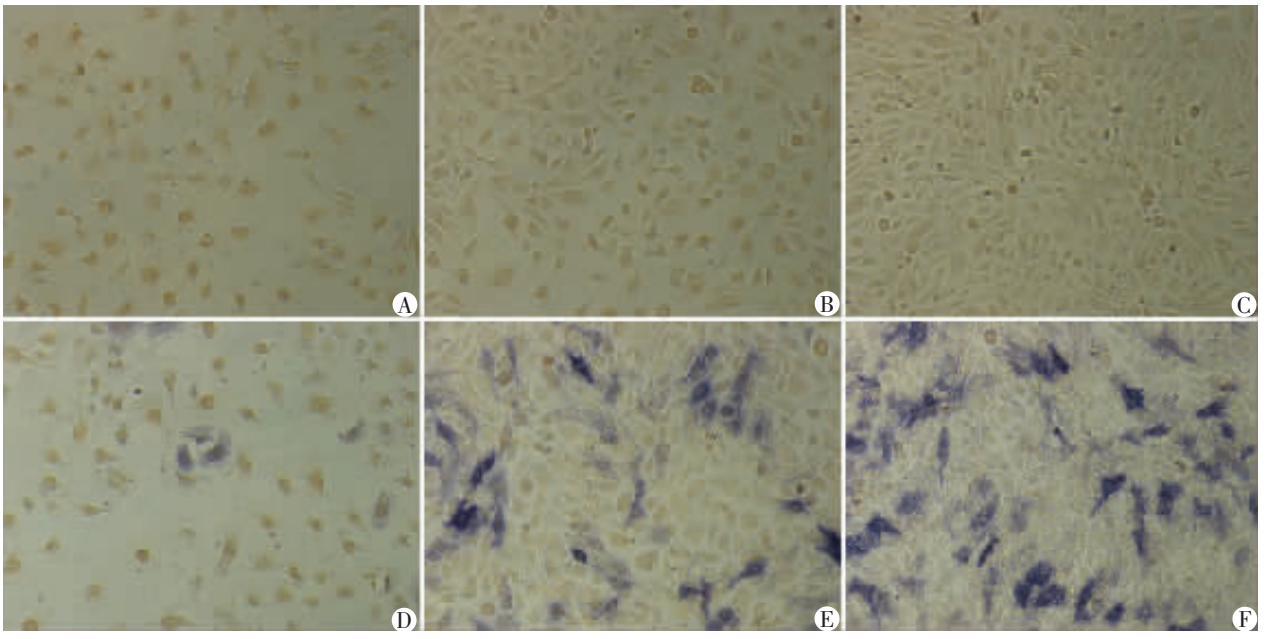
2.4 阻断 Notch 信号通路对 AdBMP9 诱导的成骨分化作用的影响

使用 DAPT(Notch 信号通路抑制剂)阻断细胞 Notch 信号通路的传递，AdBMP9 诱导的成骨分化作用明显降低($P<0.05$，图 6)。



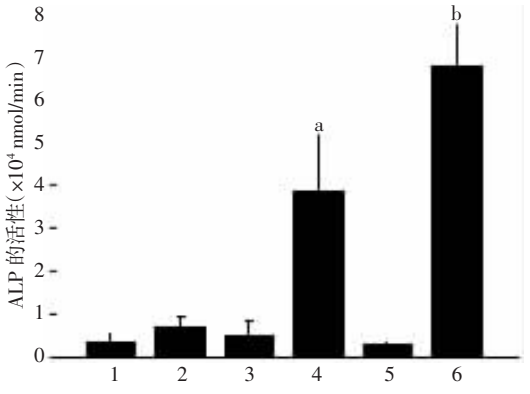
A～D：AdGFP 分别处理 1、3、5、7 d；E～H：AdBMP9 分别处理 1、3、5、7 d

图 1 AdGFP 和 AdBMP9 处理 C2C12 细胞不同时间 ALP 细胞化学染色结果 (×100)



A：20% + AdGFP；B：40% + AdGFP；C：80% + AdGFP；D：20% + AdBMP9；E：40% + AdBMP9；F：80% + AdBMP9

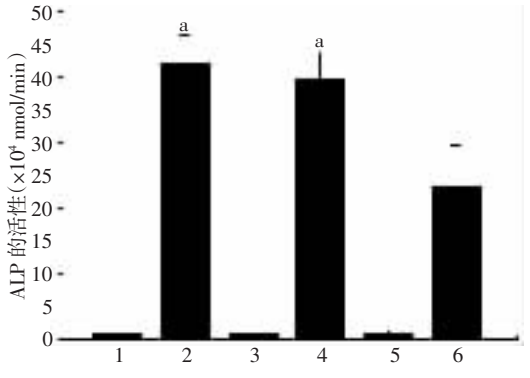
图 4　不同细胞密度下细胞化学染色检测 AdBMP9 和 AdGFP 对 ALP 表达的影响　（×100）



1：20% + AdGFP；2：20% + AdBMP9；3：40% + AdGFP；4：40% + AdBMP9；5：80% + AdGFP；6：80% + AdBMP9

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 20% + AdBMP9 比较

图 5　不同细胞密度下活性定量检测 AdBMP9 和 AdGFP 对 ALP 表达的影响



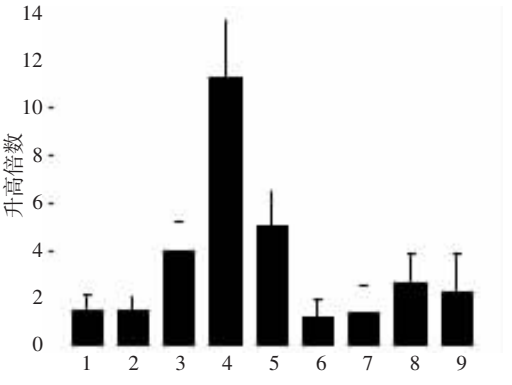
1：AdGFP；2：AdBMP9；3：DMSO + AdGFP；4：DMSO + AdBMP9；5：DAPT + AdGFP；6：DAPT + AdBMP9

a：$P<0.05$，与 DAPT + AdBMP9 比较

图 6　DAPT 抑制 Notch 信号通路后对 AdBMP9 诱导的成骨分化作用的影响

2.5　BMP9 对 Notch 信号通路配、受体表达的影响

定量 RT-PCR 检测 Notch 信号通路配、受体在第 5 天的表达情况，发现与 AdGFP 组比较，AdBMP9 作用后配、受体均不同程度的升高，其中以受体 Notch4 和配体 Jag-1 升高最为明显，分别升高 11.3 倍和 5.1 倍（图 7）。



1：Notch1；2：Notch2；3：Notch3；4：Notch4；5：Jag-1；6：Jag-2；7：Dll-1；8：Dll-2；9：Dll-3

图 7　AdBMP9 对 Notch 信号通路配受体的表达影响

3　讨论

BMP9 是 BMPs 中了解较少的一员。BMP9 除具有诱导和维持胚胎神经元的分化等多种功能外[11,12]，最近研究显示其亦具有较强的促成骨分化作用[13]，但机制不明。同时发现 BMP9 介导的多潜能干细胞成骨分化中，Notch 信号通路的经典靶基因 Hey1 表达明显上调[6]，而 Hey1 亦是 Notch 信号通路的经典靶基因。Notch 信号通路在结构上与 BMPs 信号通路不仅结构

相似,且都在个体生长发育、细胞分化增殖上发挥着重要的调控作用,故两者可能有相互作用[9,10];另一方面二者传递信号的方式不同,前者通过细胞-细胞直接接触方式,后者通过信号分子与受体表达细胞结合的间接方式进行,即两者发挥作用的阶段不同。那么在BMP9介导的成骨分化中,Notch信号通路是否参与,如果Notch信号通路在其中发挥了作用,其机制又如何,是否与细胞分化的阶段有关?

本研究首先使用C2C12细胞,采用定量RT-PCR、ALP定性(细胞染色)和定量(活性检测)等方法在验证了Kang等[5]和Sharff等[6]提出的BMP9具有促使多潜能干细胞早期成骨作用,以及在BMP9诱导的早期成骨分化过程中,会出现Hey1一过性增高的现象外,也证实BMP9促成骨分化作用与Hey1的量亦呈正相关,提示Hey1在成骨分化中起着关键的作用;另一方面,Hey1的表达水平与BMP9呈剂量依赖性,提示在该过程中Notch信号通路的传统靶基因Hey1的产生与BMP9有关,Sharff等[6]的CHIP实验结果亦证实Hey1同时也为BMP9信号通路的直接靶基因;实验中引起我们注意的是在Hey1促成骨分化过程中,不能缺少BMP9的参与,即Hey1没有单独成骨作用,似乎作为产生Hey1的经典途径的Notch信号通路并无参与BMP9诱导的多潜能干细胞成骨分化必要。

为了进一步明确这个问题,我们首先用细胞密度来间接了解通过细胞-细胞直接接触进行信号传递的Notch信号通路是否参与BMP9诱导的多潜能干细胞成骨分化。实验结果显示:AdBMP9作用下80%和40%细胞密度组ALP量($P<0.05$)和Hey1表达均高于20%组;提示Notch信号通路激活可以协同BMP9诱导多潜能干细胞向成骨分化,即在细胞密度较低(20%)时,细胞与细胞之间接触较少,Notch信号通路未被激活;而高细胞密度(80%和40%)时,细胞间接触充分,Notch通路激活与BMP9共同参与Hey1的表达进而增强成骨分化作用。我们进一步使用Notch信号通路抑制剂(DAPT)阻断Notch信号通路的信号进行观察,结果发现BMP9的成骨作用明显减弱,从而初步证明Notch信号通路在BMP9诱导的成骨分化作用中起着重要的作用。

那么,Notch信号通路是如何在BMP9诱导的成骨分化作用中发挥作用?我们检测了在AdBMP9作用下Notch通路的配、受体水平,发现其均不同程度的升高,其中以受体Notch4和配体Jag-1升高最为明显(分别为11.3倍和5.1倍)。

综上所述,Notch信号通路参与了BMP9介导的多潜能干细胞成骨分化,其可能的机制是BMP9通过诱导Notch通路配受体表达上调使Hey1升高,后者协同成骨。但Notch信号通路是否还通过其他途径影响BMP9信号通路,如对pSmad的影响等,以及Hey1是如何与下游基因作用并调节成骨等具体机制还需要进一步的实验证实。

参考文献:

[1] Wagner J, Kean T, Young R, *et al*. Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics[J]. Curr Opin Biotechnol, 2009, 20(5): 531-536.

[2] 卫静,袁发焕,周剑峰,等. BMP-7基因修饰的骨髓间充质干细胞在小鼠肾脏内的表达[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(10): 906-909.

[3] 刘建军,姚忠祥,陈兴书,等. BMP-2在成年大鼠脑内SVZa-RMS-OB通路中的表达[J]. 第三军医大学, 2006, 28(16): 1656-1658.

[4] Park K W, Waki H, Kim W K, *et al*. The small molecule phenamil induces osteoblast differentiation and mineralization[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(14): 3905-3914.

[5] Kang Q, Sun M H, Cheng H, *et al*. Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery[J]. Gene Ther, 2004, 11(17): 1312-1320.

[6] Sharff K A, Song W X, Luo X, *et al*. Hey1 basic helix-loop-helix protein plays an important role in mediating BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells[J]. J Biol Chem, 2009, 284(1): 649-659.

[7] Kadesch T. Notch signaling: the demise of elegant simplicity[J]. Curr Opin Genet Dev, 2004, 14(5): 506-512.

[8] Lai E C. Notch signaling: control of cell communication and cell fate[J]. Development, 2004, 131(5): 965-973.

[9] Walsh D W, Roxburgh S A, McGettigan P, *et al*. Co-regulation of Gremlin and Notch signalling in diabetic nephropathy[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1782(1): 10-21.

[10] Dahlqvist C, Blokzijl A, Chapman G, *et al*. Functional Notch signaling is required for BMP4-induced inhibition of myogenic differentiation[J]. Development, 2003, 130(24): 6089-6099.

[11] Cao X, Chen D. The BMP signaling and in vivo bone formation[J]. Gene, 2005, 357(1): 1-8.

[12] David L, Mallet C, Mazerbourg S, *et al*. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells[J]. Blood, 2007, 109(5): 1953-1961.

[13] Tang N, Song W X, Luo J, *et al*. BMP-9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitors requires functional canonical Wnt/beta-catenin signalling[J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(8B): 2448-2464.

(收稿:2010-07-07 修回:2010-08-18)

(编辑 龙 亮)